


 INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁴ : C02F 3/34, 3/10, 3/12 C02F 3/04	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 88/ 07976 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 20. Oktober 1988 (20.10.88)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/AT88/00020 (22) Internationales Anmeldedatum: 8. April 1988 (08.04.88) (31) Prioritätsaktenzeichen: A905/87 (32) Prioritätsdatum: 10. April 1987 (10.04.87) (33) Prioritätsland: AT (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): SOLVAY ÖSTERREICH GESELLSCHAFT M.B.H. [AT/AT]; Parkring 12, A-1015 Wien (AT). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US) : MESSNER, Kurt [AT/ AT]; Neuwaldeggerstraße 16/3/7, A-1170 Wien (AT). ERTLER, Gerhard [AT/AT]; Strohberggasse 18-20/3/1, A-1120 Wien (AT). JAKLIN-FARCHER, Susanne [AT/AT]; Franz Koci-Straße 6/15/5/29, A- 1100 Wien (AT).	(74) Anwälte: SCHÜTZ, Alfred usw.; Fleischmannngasse 9, A-1040 Wien (AT). (81) Bestimmungsstaaten: BR, DK, FI, JP, NO, US. Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i>	
(54) Title: PROCESS FOR DECOMPOSING EFFLUENTS CONTAINING LIGNIN AND/OR CHLORINATED ORGANIC COMPOUNDS USING WHITE ROT FUNGI (54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUM ABBAU VON LIGNIN UND/ODER CHLORIERTE ORGANISCHE VERBINDUNGEN ENTHALTENDEN ABWÄSSERN DURCH WEISSFÄULEPILZE (57) Abstract A process for decomposing effluents containing lignin and/or other chlorinated organic compounds, in particular bleach effluents from woodpulp works, using white rot fungi, is characterized in that white rot fungi, preferably phanerochaete chrysosporium, is previously cultivated in a porous carrier material, preferably foam plastic cubes, and the carrier material containing the cultivated fungi is then placed in contact with the substances to be decomposed. (57) Zusammenfassung Ein Verfahren zum Abbau von Lignin und/oder chlorierte organische Verbindungen enthaltenden Abwässern, insbesondere Bleichereiabwässern von Zellstofffabriken, durch Weißfäulepilze, zeichnet sich dadurch aus, daß Weißfäulepilze, bevorzugt Phanerochaete chrysosporium, in einem porösen Trägermaterial, vorzugsweise Schaumstoffwürfeln, vorkultiviert werden und anschließend das die kultivierten Pilze enthaltende Trägermaterial mit den abzubauenen Substanzen in Kontakt gebracht wird.		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	FR	Frankreich	MR	Mauritanien
AU	Australien	GA	Gabun	MW	Malawi
BB	Barbados	GB	Vereinigtes Königreich	NL	Niederlande
BE	Belgien	HU	Ungarn	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	IT	Italien	RO	Rumänien
BJ	Benin	JP	Japan	SD	Sudan
BR	Brasilien	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SN	Senegal
CG	Kongo	LI	Liechtenstein	SU	Soviet Union
CH	Schweiz	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
CM	Kamerun	LU	Luxemburg	TG	Togo
DE	Deutschland, Bundesrepublik	MC	Monaco	US	Vereinigte Staaten von Amerika
DK	Dänemark	MG	Madagaskar		
FI	Finnland	ML	Mali		

Verfahren zum Abbau von Lignin und/oder chlorierte organische
Verbindungen enthaltenden Abwässern durch Weißfäulepilze

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zum Abbau von Lignin und/oder chlorierte organische Verbindungen enthaltenden Abwässern, insbesondere Bleichereiabwässern von Zellstofffabriken, durch Weißfäulepilze.

Im Rahmen der wasserwirtschaftlichen Gesetzgebung werden in verschiedenen Ländern Europas den Zellstofffabriken Mindestanforderungen hinsichtlich der maßgebendsten Kenngröße des Frachtenabstoßes, dem chemischen Sauerstoffbedarf (CSB-Wert), gestellt. Die Einhaltung dieses Wertes erfordert vielfach die Inbetriebnahme biologischer Reinigungsanlagen. Als besonders problematisch erweisen sich in derartigen Anlagen die aus der Bleiche stammenden Frachtenabstoße. Sie enthalten zum Teil hochmolekulare chromophore Ligninverbindungen, die dem Abbau durch Bakterien weitgehend widerstehen und zu einer dunkelbraunen Färbung des Abwassers führen. Im Falle der Chlorbleiche entstehen außerdem chlorierte organische Verbindungen mit teilweise hohem Toxizitätsgrad. Der Gehalt der Abwässer an organisch gebundenem Chlor (AOX-Wert) wird in näherer Zukunft ebenfalls einer gesetzlichen Regelung unterliegen; auch die Farbe des Abwassers soll Bestandteil der Mindestanforderungen werden.

Einen eventuellen Ausweg aus der Problematik der chlorierten organischen Verbindungen stellt die Bleiche mit Sauerstoff, Wasserstoffperoxid bzw. Ozon dar. In der einschlägigen Literatur wird jedoch die Meinung vertreten, daß die Versuche mit Sauerstoff in der Bleiche von Sulfitzellstoffen keinen qualitativ ausreichenden Papierzellstoff ergeben.

Es muß daher nach neuen Verfahren gesucht werden, die neben der Senkung des CSB-Wertes zu einer Dechlorierung und Spaltung der chromophoren Verbindungen führen, wenn weiterhin ein Einsatz von Chlor in der Bleiche ermöglicht werden soll.

Sowohl in aeroben als auch in anaeroben Reinigungsanlagen wird der Abbau der organischen Substanzen hauptsächlich durch Bakterien bewirkt. Diese sind jedoch, wie Laborversuche und die Erfahrungen

ERSATZBLATT

- 2 -

aus der Praxis zeigen, nicht in der Lage, Ligninmoleküle mit höherem Molekulargewicht abzubauen. Als Grund dafür werden sterische Behinderungen angegeben. Auf Grund von aeroben Laborversuchen wurden als obere Grenze der Abbaubarkeit 850 Dalton angegeben, während in anaeroben Reaktoren auch ein Abbau einer Abwasserfraktion zwischen 1000 und 10 000 Dalton stattfand. Ein beträchtlicher Anteil des chromophoren Materials sowie des CSB war jedoch in der Fraktion mit einem Molekulargewicht größer als 100 000 enthalten.

Die in der Praxis in Belebungsanlagen zu beobachtende Farbreduktion ist im wesentlichen auf Absorption an Mikroorganismen im Belebtschlamm zurückzuführen.

Der Hauptanteil der chlorierten organischen Verbindungen aus der alkalischen Extraktionsstufe der Bleiche sind Chlorlignine sowie niedermolekulare chlorierte Phenole, z.B. Trichlorphenol, Chlorguaiacol, Chlorvanillin, Carboxy-o-chinon, Muconolacton. Für einige wurde toxische, mutagene und/oder karzinogene Wirkung nachgewiesen.

Die bei Belebungsverfahren erreichte Entfernung von 50% AOX aus dem Abwasser ist entsprechend der Farbreduktion hauptsächlich auf eine Inkorporation in den Belebtschlamm zurückzuführen.

Zur Entfernung von biologisch nicht reduzierbarem CSB und AOX werden auch physikalisch-chemische Abwasserreinigungsverfahren wie Fällung, Adsorption und Ultrafiltration vorgeschlagen. Dadurch wird das Problem aber nicht beseitigt, sondern nur auf eine andere Ebene verlagert.

Im Idealfalle sollten die makromolekularen chromophoren Chlorlignine durch Mikroorganismen abgebaut werden. Dazu sind folgende drei prinzipielle enzymatische Abbauschritte notwendig:

- Depolymerisation
- Ringspaltung
- Dechlorierung

Wie bereits erwähnt, sind Bakterien zur Depolymerisation nur unzureichend im Stande, so daß eine weitere Ringspaltung und Dechlorierung nicht ermöglicht wird. Die Dechlorierung wird nach Literaturangaben

- 3 -

im aeroben Milieu erst im Tricarbonsäurezyklus nach erfolgter Ringspaltung durchgeführt.

Die Komplexität dieser enzymatischen Reaktionen schließt den Einsatz isolierter Enzyme weitgehend aus und erfordert vielmehr das Vorhandensein lebender Organismen.

Das vollständigste Enzymsystem zum Abbau polymeren Lignins ist bei Weißfäulepilzen zu finden. Unter ihnen ist Phanerochaete chrysosporium auf Grund seiner Eigenschaften von größtem Interesse für eine biotechnologische Nutzung.

Die Charakteristika von *Phanerochaete chrysosporium* sind wie folgt:

Wachstum: -Optimaltemperatur: 38° - 40°C (reduzierte Gefahr der Fremdinfection; rasches Wachstum)

- intensive asexuelle Sporenbildung (einfache Beimpfung des Reaktors)

Ligninabbau: - Ligninabbau im Sekundärmetabolismus (bei N- oder C-Defizienz).

- Lignin als alleinige C-Quelle nicht verwertbar
- bester Abbau bei pH 4,5-5,0
- hohe "Ligninase"-Aktivität
- wenige phenoloxidierende Enzyme (keine Kondensationsreaktionen des Lignins)
- Ligninasesystem wirkt unspezifisch auf verschiedene Lignine (auch Chlorlignine)
- oxidativer Abbau (starke Belüftung bzw. O₂-Zufuhr notwendig)
- empfindlich auf intensive Bewegung im Flüssignedium.

Basierend auf diesen Eigenschaften wurde von Chang, Joyce und Kirk ein Verfahren zum Abbau von organischen Chlorverbindungen in Abwässern entwickelt, das in der US-A-4 554 075 näher beschrieben wird. Dieses Verfahren wird technisch in einem "Rotating Biological Contactor" (RBC) durchgeführt. In diesem "Fixed Film"-Reaktor ist die Biomasse

- 4 -

auf rotierenden Plexiglasscheiben fixiert, die zu etwa 40% in das mit Nährlösung versehene Abwasser tauchen. Durch langsames Drehen der Scheiben wird ein enger Kontakt des Pilzes mit dem Medium und der Gasphase bei der erforderlichen geringen Bewegung gewährleistet. Der Reaktor enthält beispielsweise 2,5 l Medium und ist in 4 Kammern, die miteinander in Verbindung stehen, geteilt. In jeder Kammer befinden sich 2 Scheiben. Der Reaktor ist durch einen Deckel verschlossen. Die Konzentration des Stickstoffes ist so gewählt, daß er nach einer viertägigen Anwuchsphase verbraucht ist und das Mycel in die sekundäre, ligninolytische Phase übergeht. Als C-Quelle können Zucker oder auf den Scheiben befestigte Zellstoffblätter dienen. Nach vier Tagen wird das Nährmedium gegen ein N-armes Medium ausgetauscht und Lignin zugegeben. Eine Zugabe von Veratrylalkohol und Tween 80 erweist sich als vorteilhaft. Vom Zeitpunkt der Ligninzugabe an wird mit O₂ belüftet (6 l pro h). Die Messung der Farbe erfolgt jeweils nach 24 Stunden bei 465 nm.

Als vorteilhaft erweist sich in diesem bekannten Verfahren die leichte Entfernbarkeit des verbrauchten Mycels von den Scheiben. Nachteilig ist hingegen, daß das Mycel in einer dicken Schicht vorliegt und das Mycel nur zu 40% in ständigen Kontakt mit der abzubauenen Substanz steht. Als erhebliche Einschränkung dieses bekannten Verfahrens ist das schlechte Oberflächen/Volumsverhältnis zu werten; außerdem ist eine starke Bewegung wegen der Scherkräfte nicht möglich.

Ein ähnliches Verfahren zum Abbau von in der Umwelt persistenten organischen Verbindungen, insbesondere halogenierten Kohlenwasserstoffen unter Einsatz von *Phanerochaete chrysosporium* wird in der EP-A1- 0 192 237 beschrieben. Spezielle Angaben bezüglich der Kultivation des Pilzes und dessen Anwendung finden sich nur im Zusammenhang mit Laborversuchen.

Es wurde nun gefunden, daß die Abbauleistung von Weißfäulepilzen erheblich dadurch verbessert werden kann, daß die Kultivation der Pilze in einem porösen Trägermaterial erfolgt und dieses anschließend

- 5 -

mit der abzubauenen Substanz in Kontakt gebracht wird.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit ein Verfahren der eingangs genannten Art, das sich dadurch auszeichnet, daß Weißfäulepilze, bevorzugt *Phanerochaete chrysosporium*, in einem porösen Trägermaterial, vorzugsweise Schaumstoffwürfeln, vorkultiviert werden und anschließend das die kultivierten Pilze enthaltende Trägermaterial mit den abzubauenen Substanzen in Kontakt gebracht wird.

Das erfindungsgemäße Verfahren weist somit die folgenden Schritte auf:

- 1.) Kultivation des Pilzes im porösen Trägermaterial: Das poröse Trägermaterial, vorzugsweise Schaumstoffwürfel, wird mit einer Nährlösung, welche ein Inokulum des Pilzes enthält (Sporen oder Hyphenstücke), getränkt. Die Nährstoffzusammensetzung wird so gewählt, daß der Pilz nach einer kurzen Wachstumsphase diese weitgehend einstellt und in die sekundäre, ligninabbauende Phase übergeht. Bis zu diesem Zeitpunkt (etwa 4 Tage) wird das poröse Trägermaterial vom Pilzmycel intensiv durchwachsen. Das Anwachsen des Pilzes erfolgt vorzugsweise unter sterilen Bedingungen. Das mit Pilzmycel durchwachsene poröse Trägermaterial kann dann in den jeweiligen Reaktor übertragen werden, in dem der Abbau der schädlichen Substanzen erfolgt.
- 2.) Abbau der Ligninverbindungen bzw. organischen Chlorverbindungen: Als Reaktor kann jedes System dienen, welches eine Tränkung der Schaumstoffwürfel mit der abzubauenen Substanz bei gleichzeitiger ausreichender Sauerstoffversorgung gewährleistet. Dies können z.B. Reaktorsysteme sein, bei denen die Schaumstoffwürfel umgewälzt werden und immer wieder kurzfristig in die Lösung mit der abzubauenen Substanz tauchen, oder Tropfkörpersysteme, bei denen die Schaumstoffwürfel ruhen und ein Durchfließen der abzubauenen Substanz stattfindet. Prinzipiell kommen auch Submers geführte Systeme, bei denen die Schaumstoffwürfel ständig untergetaucht sind, in Betracht.

- 5 -

Im erfindungsgemäßen Verfahren durchspinnt das Mycel die Poren der Schaumstoffwürfel, ist darauf fixiert und kann bei entsprechender Kultivation auch zur Pelletbildung in den Poren gebracht werden. Dadurch liegt der Pilz nicht als eine dicke, verschleimte Mycelschicht vor, sondern als freie Hyphen oder Pellets, die insgesamt eine wesentlich größere "Pilzoberfläche" bieten, welche mit der abzubauenen Substanz in Kontakt tritt. Daraus ergibt sich ein stark verbessertes Verhältnis zwischen Pilzoberfläche und Volumen der abzubauenen, sich in Lösung befindlichen Substanz. Weiterhin ist das Mycel in den Poren gut gegen Scherkräfte geschützt, sodaß eine starke Bewegung der Schaumstoffwürfel, wie z.B. in Schüttelkulturen, ohne negative Auswirkung auf die Abbauleistung des Pilzes bleibt. Darüberhinaus wird die abzubauenen Lösung in den Poren in kleine Portionen aufgeteilt, wobei dennoch ein freies Volumen erhalten bleibt, das von Luft (oder reinem Sauerstoff) erfüllt ist. In Verbindung mit dieser Portionierung der Lösung wird ein gutes Eindiffundieren des Luftsauerstoffes (oder reinen Sauerstoffes) ermöglicht. Da der Abbau von Lignin ein oxidativer Vorgang ist, ist eine ausreichende Sauerstoffzufuhr zur Hyphe ein für die Abbauleistung limitierender Faktor. Diese Forderung wird im Schaumstoffsystem in idealer Weise erfüllt.

Im erfindungsgemäßen Verfahren wird weiterhin durch das Schaumstoffsystem eine ständige Benetzung des Mycels gewährleistet. Die Belüftung und der Abbau können somit gleichzeitig stattfinden.

Soweit bisher aus der Literatur bekannt ist, wird das ligninolytische Enzymsystem von Weißfäulepilzen nur in der sekundären Wachstumsphase, in der kein nennenswerter Mycelzuwachs mehr erfolgt, gebildet. Ein Zuwachsen der Poren ist, da das erfindungsgemäße Verfahren hauptsächlich in der sekundären Wachstumsphase geführt wird, nicht möglich. Somit ist das erfindungsgemäß vorgesehene Schaumstoffsystem gerade für den Einsatz zum angeführten Zweck ideal geeignet.

Das erfindungsgemäße Verfahren ergab im Labor bei Durchführung von Schüttelversuchen mit dem Pilz *Phanerochaete chrysosporium* und Einsatz von aus der Bleiche einer Sulfitzellstofffabrik stammenden

- 7 -

Abwasser eine Steigerung der Abbauleistung (ausgedrückt als Farbaufhellung) von etwa 40 - 50% pro 24 Stunden im Scheibenreaktor nach der US-A-4 554 075 auf etwa 30% pro 24 Stunden im Schaumstoffsystem. Überdies wurde im Schaumstoffsystem eine weitaus höhere Konstanz der Werte erzielt. Versuche ohne zusätzliche Sauerstoffzufuhr ergaben nur etwas niedrigere Werte, was den guten Sauerstoffübergang im Schaumstoffsystem beweist.

Das erfindungsgemäße Verfahren ist für alle Aktivitäten anwendbar, die von Weißfäulepilzen entwickelt werden, insbesondere Klärung von ligninhaltigen Abwässern und ihre Dechlorierung, Dechlorierung anderer organischer Verbindungen, Produktion von Enzymen des Ligninabbaues und dergleichen.

Die im erfindungsgemäßen Verfahren bevorzugt zum Einsatz gelangenden Schaumstoffwürfel können aus beliebigen, unter den Einsatzbedingungen chemisch inerten, physikalisch beständigen und möglichst abriebarmen Schaumstoffen bestehen.

PATENTANSPRÜCHE:

1. Verfahren zum Abbau von Lignin und/oder chlorierte organische Verbindungen enthaltenden Abwässern, insbesondere Bleichereiabwässern von Zellstofffabriken, durch Weißfäulepilze, dadurch gekennzeichnet, daß Weißfäulepilze, bevorzugt Phanerochaete chrysosporium, in einem porösen Trägermaterial, vorzugsweise Schaumstoffwürfeln, vorkultiviert werden und anschließend das die kultivierten Pilze enthaltende Trägermaterial mit den abzubauenen Substanzen in Kontakt gebracht wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß zur Kultivierung des Pilzes das poröse Trägermaterial mit einer ein Inokulum des Pilzes enthaltenden Nährlösung getränkt wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß das mit Pilzmycel durchwachsene poröse Trägermaterial in einem Reaktor unter gleichzeitiger Sauerstoffversorgung mit den abzubauenen Substanzen in Kontakt gebracht wird.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die mit Pilzmycel durchwachsenen Schaumstoffwürfel in einem Umwälzreaktor wiederholt in eine die abzubauenen Substanzen enthaltende Lösung getaucht werden.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die mit Pilzmycel durchwachsenen Schaumstoffwürfel in einem Tropfkörpersystem von einer die abzubauenen Substanzen enthaltenden Lösung durchströmt werden.

ERSATZBLATT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/AT 88/00020

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (If several classification symbols apply, indicate all) ⁶		
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC		
Int. Cl. ⁴ C 02 F 3/34; 3/10; 3/12; 3/04		
II. FIELDS SEARCHED		
Minimum Documentation Searched ⁷		
Classification System	Classification Symbols	
Int. Cl. ⁴	C 02 F	
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched ⁸		
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT ⁹		
Category ⁹	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³
Y	Tappi, vol. 65, No. 6, 1982 D.C. Eaton et al.: "Method obtains fungal reduction of the color of extraction-stage kraft bleach effluents", pages 89-92, see page 89, left hand column - middle column; paragraph 2; page 91, paragraph "Bench-scale reactor"; paragraph 1	1-5
Y	EP, A, 0091121 (LINDE) 12 October 1983, see page 1, line 15 - page 2, line 19; page 3, lines 3-9	1-5
A	EP, A, 0100007 (LINDE) 8 February 1984, see front page; abstract; fig.	3,4
A	EP, A, 0075298 (LINDE) 30 March 1983, see page 7, line 15 - page 8, line 20	3,4
A	US, A, 3293174 (ICI) 20 December 1966, see column 4, claims 1-8; column 1, line 71 - column 2, line 6	5
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>¹⁰ Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"G" document member of the same patent family</p> </div> </div>		
IV. CERTIFICATION		
Date of the Actual Completion of the International Search	Date of Mailing of this International Search Report	
5 July 1988 (05.07.88)	19 July 1988 (19.07.88)	
International Searching Authority	Signature of Authorized Officer	
EUROPEAN PATENT OFFICE		

**ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.**

AT 8800020
SA 21729

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on 11/07/88. The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A- 0091121	12-10-83	DE-A- 3213074	20-10-83
		US-A- 4469600	04-09-84
		US-A- 4470906	11-09-84
		CA-A- 1202128	18-03-86
EP-A- 0100007	08-02-84	DE-A- 3228365	02-02-84
		US-A- 4521311	04-06-85
EP-A- 0075298	30-03-83	DE-A- 3137055	24-03-83
		JP-A- 58067395	21-04-83
		US-A- 4566971	28-01-86
US-A- 3293174		Keine	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen **PCT/AT 88/00020**

I. KLASSEFIZKATION DES ANMELDUNGSGEGENSTANDS (bei mehreren Klassifikationssymbolen sind alle anzugeben) ⁶ Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC Int. Cl. 4 C 02 F 3/34; 3/10; 3/12; 3/04																				
II. RECHERCHIERTE SACHGEBIETE <div style="text-align: center; margin-top: 10px;"> Recherchierter Mindestprüfstoff⁷ </div> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; margin-top: 5px;"> <tr> <td style="width: 25%; padding: 5px;">Klassifikationssystem</td> <td style="padding: 5px;">Klassifikationssymbole</td> </tr> <tr> <td style="padding: 5px;">Int. Cl. 4</td> <td style="padding: 5px; text-align: center;">C 02 F</td> </tr> </table> <div style="text-align: center; margin-top: 10px;"> Recherchierte nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Sachgebiete fallen⁸ </div>			Klassifikationssystem	Klassifikationssymbole	Int. Cl. 4	C 02 F														
Klassifikationssystem	Klassifikationssymbole																			
Int. Cl. 4	C 02 F																			
III. EINSCHLÄGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN⁹ <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; margin-top: 5px;"> <tr> <th style="width: 10%; padding: 5px;">Art*</th> <th style="width: 70%; padding: 5px;">Kennzeichnung der Veröffentlichung¹¹, soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile¹²</th> <th style="width: 20%; padding: 5px;">Betr. Anspruch Nr. 13</th> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">Y</td> <td style="padding: 5px;"> Tappi, Band 65, Nr. 6, 1982 D.C. Eaton et al.: "Method obtains fungal reduction of the color of extraction-stage kraft bleach effluents", Seiten 89-92, siehe Seite 89, linke Spalte - mittlere Spalte; Absatz 2; Seite 91, Absatz "Bench-scale reactor"; Absatz 1 </td> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">1-5</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">Y</td> <td style="padding: 5px;"> EP, A, 0091121 (LINDE) 12. Oktober 1983, siehe Seite 1, Zeile 15 - Seite 2, Zeile 19; Seite 3, Zeilen 3-9 </td> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">1-5</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">A</td> <td style="padding: 5px;"> EP, A, 0100007 (LINDE) 8. Februar 1984, siehe Titelseite; Zusammenfassung; Figur </td> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">3,4</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">A</td> <td style="padding: 5px;"> EP, A, 0075298 (LINDE) 30. März 1983, siehe Seite 7, Zeile 15 - Seite 8, Zeile 20 </td> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">3,4</td> </tr> <tr> <td colspan="2" style="text-align: right; padding: 5px;">--</td> <td style="text-align: center; padding: 5px;">./.</td> </tr> </table>			Art*	Kennzeichnung der Veröffentlichung ¹¹ , soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile ¹²	Betr. Anspruch Nr. 13	Y	Tappi, Band 65, Nr. 6, 1982 D.C. Eaton et al.: "Method obtains fungal reduction of the color of extraction-stage kraft bleach effluents", Seiten 89-92, siehe Seite 89, linke Spalte - mittlere Spalte; Absatz 2; Seite 91, Absatz "Bench-scale reactor"; Absatz 1	1-5	Y	EP, A, 0091121 (LINDE) 12. Oktober 1983, siehe Seite 1, Zeile 15 - Seite 2, Zeile 19; Seite 3, Zeilen 3-9	1-5	A	EP, A, 0100007 (LINDE) 8. Februar 1984, siehe Titelseite; Zusammenfassung; Figur	3,4	A	EP, A, 0075298 (LINDE) 30. März 1983, siehe Seite 7, Zeile 15 - Seite 8, Zeile 20	3,4	--		./.
Art*	Kennzeichnung der Veröffentlichung ¹¹ , soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile ¹²	Betr. Anspruch Nr. 13																		
Y	Tappi, Band 65, Nr. 6, 1982 D.C. Eaton et al.: "Method obtains fungal reduction of the color of extraction-stage kraft bleach effluents", Seiten 89-92, siehe Seite 89, linke Spalte - mittlere Spalte; Absatz 2; Seite 91, Absatz "Bench-scale reactor"; Absatz 1	1-5																		
Y	EP, A, 0091121 (LINDE) 12. Oktober 1983, siehe Seite 1, Zeile 15 - Seite 2, Zeile 19; Seite 3, Zeilen 3-9	1-5																		
A	EP, A, 0100007 (LINDE) 8. Februar 1984, siehe Titelseite; Zusammenfassung; Figur	3,4																		
A	EP, A, 0075298 (LINDE) 30. März 1983, siehe Seite 7, Zeile 15 - Seite 8, Zeile 20	3,4																		
--		./.																		
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen¹⁰:</p> <p>"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist</p> <p>"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</p> <p>"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)</p> <p>"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht</p> <p>"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist</p> <p>"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden</p> <p>"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist</p> <p>"G" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist</p> </div> </div>																				
IV. BESCHEINIGUNG <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; margin-top: 5px;"> <tr> <td style="width: 50%; padding: 5px;"> Datum des Abschlusses der internationalen Recherche <div style="text-align: center; margin-top: 5px;">5. Juli 1988</div> </td> <td style="width: 50%; padding: 5px;"> Absendedatum des internationalen Recherchenberichts <div style="text-align: center; margin-top: 5px;">19 JUL 1988</div> </td> </tr> <tr> <td style="padding: 5px;"> Internationale Recherchenbehörde <div style="text-align: center; margin-top: 10px;">Europäisches Patentamt</div> </td> <td style="padding: 5px;"> Unterschrift des bevollmächtigten Bediensteten <div style="text-align: center; margin-top: 10px;"> P.C.G. VAN DER PUTTEN </div> </td> </tr> </table>			Datum des Abschlusses der internationalen Recherche <div style="text-align: center; margin-top: 5px;">5. Juli 1988</div>	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts <div style="text-align: center; margin-top: 5px;">19 JUL 1988</div>	Internationale Recherchenbehörde <div style="text-align: center; margin-top: 10px;">Europäisches Patentamt</div>	Unterschrift des bevollmächtigten Bediensteten <div style="text-align: center; margin-top: 10px;"> P.C.G. VAN DER PUTTEN </div>														
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche <div style="text-align: center; margin-top: 5px;">5. Juli 1988</div>	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts <div style="text-align: center; margin-top: 5px;">19 JUL 1988</div>																			
Internationale Recherchenbehörde <div style="text-align: center; margin-top: 10px;">Europäisches Patentamt</div>	Unterschrift des bevollmächtigten Bediensteten <div style="text-align: center; margin-top: 10px;"> P.C.G. VAN DER PUTTEN </div>																			

III. EINSCHLÄGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN (Fortsetzung von Blatt 2)		
Art *	Kennzeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	US, A, 3293174 (ICI) 20. Dezember 1966, siehe Spalte 4, Ansprüche 1-8; Spalte 1, Zeile 71 - Spalte 2, Zeile 6 -----	5

**ANHANG ZUM INTERNATIONALEN RECHERCHENBERICHT
ÜBER DIE INTERNATIONALE PATENTANMELDUNG NR.**

AT 8800020
SA 21729

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten internationalen Recherchenbericht angeführten Patentedokumente angegeben.
Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am 11/07/88
Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

Im Recherchenbericht angeführtes Patentedokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP-A- 0091121	12-10-83	DE-A- 3213074	20-10-83
		US-A- 4469600	04-09-84
		US-A- 4470906	11-09-84
		CA-A- 1202128	18-03-86
EP-A- 0100007	08-02-84	DE-A- 3228365	02-02-84
		US-A- 4521311	04-06-85
EP-A- 0075298	30-03-83	DE-A- 3137055	24-03-83
		JP-A- 58067395	21-04-83
		US-A- 4566971	28-01-86
US-A- 3293174		Keine	

EPO FORM P0473

Für nähere Einzelheiten zu diesem Anhang : siehe Amtsblatt des Europäischen Patentamts, Nr.12/82

PTO 04-5307

CY=WO DATE=19881020 KIND=A1
PN=88-07976

PROCESS FOR DECOMPOSING WASTE WATER CONTAINING LIGNIN AND/OR
CHLORINATED ORGANIC COMPOUNDS USING WHITE ROT FUNGI
[Verfahren zum Abbau von Lignin und/oder chlorierte organische
Verbindungen enthaltenden Abwässeern durch Weissfäulepilze]

K. Messner, et al.

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE
Washington, D.C. September 2004

Translated by: FLS, Inc.

PUBLICATION COUNTRY	(10):	WO
DOCUMENT NUMBER	(11):	88/07976
DOCUMENT KIND	(12):	A1
	(13):	Application
PUBLICATION DATE	(43):	19881020
PUBLICATION DATE	(45):	
APPLICATION NUMBER	(21):	PCT/AT8800020
APPLICATION DATE	(22):	19880408
ADDITION TO	(61):	
INTERNATIONAL CLASSIFICATION	(51):	C02F 3/34
DOMESTIC CLASSIFICATION	(52):	
PRIORITY COUNTRY	(33):	AT
PRIORITY NUMBER	(31):	A905/87
PRIORITY DATE	(32):	19870410
INVENTOR	(72):	Messner, K.; Ertler, G.; Jaklin-Farcher, S.
APPLICANT	(71):	VARIABLE
TITLE	(54):	PROCESS FOR DECOMPOSING WASTE WATER CONTAINING LIGNIN AND/OR CHLORINATED ORGANIC COMPOUNDS USING WHITE ROT FUNGI
FOREIGN TITLE	[54A]:	Verfahren zum Abbau von Lignin und/oder chlorierte organische Verbindungen enthaltenden Abwässeern durch Weissfäulepilze

The present invention relates to a method for decomposing waste /1* water containing lignin and/or chlorinated organic compounds, in particular bleach waste water from wood pulp works, using white rot fungi.

Waste management laws in several European countries provide minimum requirements for wood pulp works with regard to the most critical effluent parameter, the chemical oxygen demand (COD). Maintaining this value frequently requires the use of biological purification facilities. Particularly problematic is bleach effluent from such facilities. It contains, in part, high-molecular chromophoric lignin compounds, which are highly resistant to decomposition by bacteria and which turn the waste water dark brown. In the case of chlorine bleaches, chlorinated organic compounds are also produced, some of which are highly toxic. The amount of organically bound chlorine (AOX value) in waste water will also be regulated by law in the near future. The color of the waste water should also be a part of the minimum requirements.

One possible way out of the problem of chlorinated organic compounds is the use of bleaches with oxygen, hydrogen peroxide, and ozone. It has been stated in the pertinent literature, however, that experiments with oxygen in the bleach of sulfite pulps does not provide paper pulp of satisfactory quality.

* Numbers in the margin indicate pagination in the foreign text.

Consequently, new methods must be sought that, in addition to reducing the COD value, result in dechlorination and breakdown of chromophoric compounds, if chlorine continues to be used in the bleach.

Organic substances are broken down primarily by bacteria at both aerobic and anaerobic purification plants. However, as demonstrated in laboratory studies and practical experience, bacteria are /2 incapable of breaking down lignin molecules of high molecular weight. Steric hindrance is considered to be the cause. Based on aerobic lab studies, the upper limit of degradability is indicated at 850 daltons, while in anaerobic reactors a waste water fraction between 1,000 and 10,000 daltons was also broken down. However, a significant portion of the chromophoric material and of the COD was contained in the fraction having a molecular weight greater than 100,000.

The color reduction observed in practice at activated sludge plants is due essentially to absorption on microorganisms in the activated sludge.

The main part of the chlorinated organic compounds from the alkaline extraction stage of bleaching are chlorolignins and low-molecular chlorinated phenols, e.g., trichlorophenol, chloroguaiacol, chlorovanillin, carboxy-o-quinone, and muconolactone. Some of these have been demonstrated to have toxic, mutagenic, and/or carcinogenic effects.

Judging from the reduction in coloring, the 50% AOX removal from waste water in activated-sludge procedures is mainly due to their incorporation into the activated sludge.

Physical/chemical waste water purification methods such as precipitation, adsorption, and ultrafiltration are also proposed for removing COD and AOX substances that cannot be reduced biologically. This does not eliminate the problem, however, but only transfers it to a different level.

In the ideal case, the macromolecular chromophoric chlorolignins would be broken down by microorganisms. This requires the following three basic enzymatic decomposition steps:

- Depolymerization
- Ring cleavage
- Dechlorination

As previously mentioned, bacteria are not sufficiently capable of depolymerization, so that additional ring cleavage and dechlorination are not possible. According to information in the literature, the dechlorination can be carried out in an aerobic environment in the tricarboxylic acid cycle only after successful ring cleavage. /3

The complexity of this enzymatic reaction basically rules out the use of isolated enzymes and requires the presence of living organisms.

The most complete enzyme system for breaking down polymeric lignins found in white rot fungi. Because of its properties, *Phanerochaete chrysosporium* is of the greatest interest for biotech usage.

The characteristics of *Phanerochaete chrysosporium* are as follows:

Growth: -Optimum temperature: 38 - 40°C (reduced danger of outside infection; rapid growth)

 - Intensive asexual spore formation (simple inoculation of the reactor)

Lignin decomposition:

- Lignin decomposition in secondary metabolism (with N or C deficiency).
- Lignin as only C source not usable
- Best decomposition at pH 4.5-5.0
- High "ligninase" activity
- Little phenol-oxidizing enzyme (no condensation reactions of the lignin)
- Ligninase system works nonspecifically on various lignins (including chlorolignins)
- Oxidative decomposition (strong ventilation or O₂ supply necessary)
- Sensitive to intensive motion in liquid medium.

Based on these properties, Chang, Joyce, and Kirk developed a method of breaking down organic chloro compounds in waste water that is described in greater detail in US-A-4,554,075. The technology used for this process is a "Rotating Biological Contactor" (RBC). In this "fixed film" reactor, the biomass is fixed on rotating plexiglass /4 disks, approximately 40% of which are immersed in the waste water, which is provided with nutrient solution. Slow rotation of the disks provides close contact between the fungus and the medium and gas phase, with the required slow motion. The reactor contains, for example, 2.5 liters medium and is divided into 4 chambers, which are connected to one another. Each chamber contains 2 disks. The reactor is closed off with a cover. The nitrogen concentration is chosen so that it is used up after a four-day growth phase and the mycelia enter the secondary, ligninolytic phase. Sugar or wood-pulp board attached to the disks can serve as the C source. After four days, the nutrient medium is replaced with a low-N medium and lignin is added. Adding veratryl alcohol and Tween 80 has proven advantageous. O₂ ventilation (6 liters/h) is used from the time the lignin is added. The color is measured after 24 hours at 465 nm.

In this known process, the easy removal of the used mycelia from the disks has proven advantageous. The disadvantage, on the other hand, is that the mycelia are present in a thick layer and the mycelia are in constant contact with only 40% of the substance that is to be decomposed. A significant limitation of this known method is the poor

surface/volume ratio. Moreover, strong movement is impossible, due to the shearing forces.

A similar process for decomposing persistent organic compounds in the environment, particularly halogenated hydrocarbons, using *Phanerochaete chrysosporium* is described in EP-A1-0 192 237. Special information on cultivation of the fungus and its application is found only by laboratory experiments.

It has now been found that the decomposing ability of white rot fungi can be significantly improved if cultivation of the fungus occurs in a porous carrier material and if the latter is then brought into contact with the substance that is to be decomposed. /5

The subject matter of the present invention is therefore a method of the type mentioned at the outset that is characterized in that white rot fungi, preferably *Phanerochaete chrysosporium*, is previously cultivated in a porous carrier material, preferably foamed plastic cubes, and subsequently the carrier material containing the cultivated fungus is brought into contact with the substances to be decomposed.

Thus, the method of this invention includes the following steps:

- 1.) Cultivation of the fungus in a porous carrier material: The porous carrier material, preferably foamed plastic cubes, is impregnated with a nutrient solution containing an inoculum of the fungus (spores or hyphal fragments). The composition of the nutrient is selected such that after a brief growth phase the fungus essentially ends this phase and enters the secondary, lignin-

decomposing phase. Up to this point in time (approximately 4 days) the fungal mycelia grow intensively through the porous carrier material. The fungus preferably grows under sterile conditions. The porous carrier material with fungal mycelia growing in it can then be placed in the respective reactor in which the harmful substances are to be broken down.

2.) Decomposition of the lignin compounds and organic chlorine compounds: The reactor may be any system that provides for impregnation of the foamed plastic cubes with the substance that is to be decomposed, while at the same time allowing a sufficient oxygen supply. This may be, for example, reactor systems in which the foamed plastic cubes are circulated and repeatedly immersed for short periods of time in the solution with the substance that is to be broken down or percolating systems in which the foamed plastic cubes remain stationary and the substance to be decomposed flows through them. In principle, submersed systems can also be used, in which the foamed plastic cubes are constantly submersed.

In the method of this invention, the mycelia spin through the pores of the foamed plastic cubes, become fixed on them, and with the proper cultivation can form pellets in the pores. In this way, the fungus is not present in the form of a thick, congested mycelial layer, but as free hyphae or pellets, which provide a much greater "fungal surface," which comes into contact with the substance that is

to be decomposed. This provides a much improved ratio between the fungus surface and the volume of the substance that is to be decomposed, which is present in the solutions. Moreover, the mycelia in the pores are well protected against shearing forces, so that strong movement of the foamed plastic cube, e.g., in shaken cultures, has no adverse effect on the decomposing ability of the fungus. In addition, the solution that is to be broken down is divided into small portions in the pores, whereby a free volume remains for air (or pure oxygen). This portioning of the solution provides a good final diffusion of the atmospheric oxygen (or pure oxygen). Since the decomposition of lignin is an oxidative process, a sufficient supply of oxygen to the hyphae is a limiting factor for the decomposing ability. This requirement is ideally met in the foamed plastic system.

With the foamed plastic system, the method of this invention provides constant wetting of the mycelia. Thus, ventilation and decomposition can occur at the same time.

In the past literature, the ligninolytic enzyme system of white rot fungi is formed only in the secondary growth phase, in which no more appreciable mycelium growth occurs. Since the method of this invention is carried out primarily in the secondary growth phase, no growth in the pores is possible. Thus, the foamed plastic system of this invention is ideal for use for the purpose indicated above.

In shaking experiments conducted in the laboratory with the fungus *Phanerochaete chrysosporium* using waste water from the bleach

of a sulfite pulp plant, the method of this invention increased the /7
decomposing ability (expressed as lightening of the color) from
approximately 40-50% in 24 hours in the disk reactor of US-A-4,554,075
to approximately 80% in 24 hours in the foamed plastic system.
Moreover, in the foamed plastic system a greater constancy was
achieved in this value. Experiments without an additional oxygen
supply yielded only slightly lower values, which demonstrated the good
oxygen transition in the foamed plastic system.

The method of this invention may be used in all activities of
white rot fungi, in particular clarification and dechlorination of
lignin-containing waste water, dechlorination of other organic
compounds, the production of enzymes for lignin decomposition, etc.

The foamed plastic cubes preferably used in the method of this
invention may be made of any foamed plastics that are chemically
inert, physically resistant, and as abrasion resistant as possible
under the conditions in which they are used.

Claims

/8

1. A method for decomposing waste water containing lignin and/or
chlorinated organic compounds, in particular bleach waste water from
wood pulp works, using white rot fungi, characterized in that white
rot fungi, preferably *Phanerochaete chrysosporium*, is previously
cultivated in a porous carrier material, preferably foamed plastic
cubes, and subsequently the carrier material containing the cultivated
fungi is brought into contact with the substances to be decomposed.

2. A method as recited in Claim 1, characterized in that, for cultivating the fungus, the porous carrier material is impregnated with a nutrient solution containing an inoculum of the fungus.

3. A method as recited in Claim 1 and 2, characterized in that the fungus-loaded porous carrier material is brought into contact with the substances that are to be decomposed in a reactor, while simultaneously providing a supply of oxygen.

4. A method as recited in one of the Claims 1 to 3, characterized in that the fungus-loaded foamed plastic cubes are repeatedly immersed in a solution containing the substances to be decomposed in a circulating reactor.

5. A method as recited in one of the Claims 1 through 3, characterized in that a solution containing the substances to be decomposed flows through the fungus-loaded foamed plastic cubes in a percolating system.